

근조직 및 배양 근세포에서의 Dysferlin 발현과 그 의의

연세대학교 의과대학 신경과학교실

이은영 최영철

Dysferlin Expression in Skeletal muscles of Patients with Myopathy and Cultured Human Myoblast/Myotube

Eung Young Lee, M.S., Young-Chul Choi, M.D., Ph.D.

Departments of Neurology, Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Dysferlin is a 230 kDa protein of the sarcolemma. This encoding gene is mutated in patients with dysferlinopathy (limb-girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy), which is characterized by an active muscle degeneration and regeneration process. Dysferlin is known to play an essential role in muscle signaling and muscle fiber repair. We studied the gene to define its functional role in muscle repair and differentiation in human skeletal muscle of the patients with myopathies and cultured human myoblast.

Methods: An immunohistochemical analysis of dysferlin and N-CAM in biopsied muscle tissue obtained from eleven patients with myopathies [six patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD), two patients with dermatomyositis (DM), two patients with polymyositis (PM), and one patient with dysferlinopathy (MM)] and eight normal controls. Cultured human myoblast obtained from normal muscle tissue was also analyzed by the expression of dysferlin through immunocytochemical staining and western blot.

Results: The immunoreactivity of dysferlin was strongly expressed in regenerative muscle fibers of myopathies except dysferlinopathy, which was co-localization with N-CAM by double immunohistochemistry. By western blot analysis, the expression level of dysferlin was variable in myopathies compared to normal controls, but no expression in dysferlinopathy. The expression of dysferlin in myotubes was significantly increased compared to that in myoblast by immunostaining and western blot analysis.

Conclusions: These results indicated that the expression of dysferlin increased in regenerative and degenerative muscle fibers and also increased in myoblast differentiation. Our study supports that dysferlin not only has a role in skeletal muscle development but also in regeneration/repair process.

J Korean Neurol Assoc 25(4):521-529, 2007

Key Words: Dysferlin, Myopathy, Myoblast, Degeneration, Regeneration, Differentiation

서 론

Dysferlin 유전자는 1994년 지대형 근이영양증 2B형(limb-

Received June 25, 2007 Accepted August 2, 2007

* Young-Chul Choi, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Yongdong Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, 146-92 Dogok-dong, Gangnam-gu, Seoul, 135-720, Korea

Tel: +82-2-2019-3322 Fax: +82-2-3462-5904

E-mail: ycchoi@yuhs.ac

* This work was supported by the Brain Korea 21 Project for medical Science, Yonsei University.

girdle muscular dystrophy 2B; LGMD2B)을 연구하던 Bashir 등과 1998년 미요시 근병증(Miyoshi myopathy)을 연구하던 Liu 등에 의해 클로닝되면서 연구되기 시작하였다. 이 유전자는 제2번 염색체 단완 2p13에 위치하며 55개의 엑손(exon)으로 구성되어 있다.¹⁻³ Dysferlin 단백질은 230kDa 크기의 분자로서 골격근, 심장, 신장에 높은 농도로 존재하고, 근섬유조직의 경우 근섬유막에 존재하나 dysferlinopathy 환자의 경우에는 dysferlin 유전자의 돌연변이로 인하여 근골격에서 단백질이 결핍되어 지대형 근이영양증 2B형과 미요시 근병증 등을 일으킨다.⁴ Dysferlin은 dystrophin glycoprotein complex

(DGC)를 구성하지 않으며, C-말단 영역이 세포막을 가로질러 근섬유의 표면에 발현된다.^{5,6}

Dysferlin의 기능은 단백질 결핍 시에 나타나는 근섬유의 괴사와 퇴화를 이유로 치유 및 재생과의 관련성이 주장되고 있고,⁷ 최근에는 골격근 막 재생에 관련된다고 연구되었다.^{8,9} Dysferlin이 결핍된 미요시 근병증 또는 지대형 근이영양증 2B형 환자의 근육은 근섬유의 퇴화뿐만 아니라 근병증과 관련된 염증 반응도 동반된다.¹⁰ 이러한 염증과 이와 관련된 보체 반응 경로의 활성화는 근육 재생의 표지로 여겨진다.¹¹ 또한 dysferlin-null mice를 사용한 최근 연구는 dysferlin이 막 융합과 회복 절차를 수반한다고 제안하고 있으며,⁸ 활성화된 위성세포의 수를 확인한 실험 결과는 dysferlinopathy 환자의 경우 위성세포의 수가 정상인 대조군에 비해서는 증가하였으나 다른 근병증을 가진 환자에 비해서는 적게 증가하여 재생 과정에서 dysferlin이 중요한 역할을 한다는 의견을 제기하고 있다.¹² 이런 결과에서 dysferlin이 결핍된 근육의 퇴화가 근육을 치유하는 기관의 파괴로 인한 것이라는 점은 질환의 발병 시 세포막 보전을 위해 작용하는 세포 기전의 중요성을 잘 보여주는 좋은 예이다.¹³ 또한 미세배열기술(microarray)을 사용하여 근육 발생 및 세포 내 단백질 이동, 단백질 분해 과정 동안의 유전자 과발현을 보여준 dysferlinopathy 유전자 발현 프로파일링(gene-expression profiling)은 활성화된 근육의 퇴화와 재생 과정을 암시하고 있다.¹⁴

Dysferlin의 기능을 추측할 수 있는 것 중 하나는 칼슘 의존 인지질 결합(calcium dependent phospholipid binding)과 관련된 C2 영역의 존재이다.^{2,15} 근육모세포 융해와 세포막 재봉합 과정은 특정화된 소포(caveolae)를 사용하며, 이 소포의 칼슘 민감도에 의해 융해 과정이 조절될 것이라고 여겨진다. 이는 dysferlin이 칼슘 감지 장치로서 활동할 것이라고 추측할 수 있다.¹⁶ 또한 이와 관련하여 근섬유 소포 내의 막 통과 단백질인 caveolin-3와 dysferlin 사이의 상호작용인 소포의 신호 표시 기능도 dysferlin의 역할로 제안되고 있다.¹⁷

Mouse cell line C2C12를 사용해 수행된 연구 결과에 따르면 dysferlin이 근육모세포에서는 낮게, 성숙된 근관세포에서는 높게 발현되었다.¹⁸ 그리고 정상인의 근세포 배양에서 dysferlin의 mRNA와 단백질 발현이 근육모세포 단계보다 다핵화된 근관세포에서 더 높아진다고 보고되었다. 이는 dysferlin이 근육 분화 과정 시에 중요한 역할을 한다고 추측할 수 있다.^{19,20}

근육은 재생이 가능한 기관이며, 근육 손상 후 일어나는 재생 과정은 근육 발생 과정의 일부와 유사하다.¹⁶ 따라서 본 연구에서는 배양된 근세포에서 발생 및 분화 시의 dysferlin 발현과

증감을 알아보고, 이와 관련하여 정상인과 다양한 근병증 환자의 골격근에서 dysferlin이 근조직의 괴사, 염증 반응 시 갖는 특징 및 퇴화와 재생에 따른 분포, 증감 등의 관계를 확인하여 그 의의를 알아보고자 한다.

대상과 방법

1. 대상

실험 대상으로는 정상인의 근조직에서 얻어 배양한 근육모세포 및 이를 분화시킨 근관세포와 뒤시엔느형 근이영양증 환자 6명, 다발성근염 환자 2명, 피부근염 환자 2명, dysferlin 발현 음성 대조군으로 dysferlinopathy 환자 1명, 정상인 8명의 근조직을 사용하였다. 대상 환자 및 정상 대조군의 근조직은 모두 진단 목적으로 근생검을 시행하여 얻었고, 환자의 동의를 얻어 실험을 진행하였다.

2. 방법

1) 세포배양 및 분화

정상인의 근조직 1-2 g을 phosphate buffer pH 7.2 (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)로 씻어낸 후 가위와 칼을 이용해 잘게 다졌다. 이 조직을 20 ml 분해용액[조성: 2 ml 0.05% trypsin-0.53 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA; Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA), 4 ml 0.2% collagenase type IV (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA), 14 ml phosphate buffer (no Cl, Mg, pH 7.2)]에 담아 37°C, 5% CO₂에서 30-45분간 처리하였다. 이차 분해 작용을 위해 10 ml 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA를 첨가하고 37°C, 5% CO₂에서 30분간 처리한 후 10 ml dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA) +20% fetal bovine serum (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)을 첨가하여 trypsin을 중화시켰다. 40 µm 세포 여과기(Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)로 걸러내 세포를 얻어내고 10 ml DMEM-20% fetal bovine serum을 첨가하여 배양하였다.

세포분화를 위하여 세포 밀도가 70% 이상 자라면 DMEM-2% horse serum (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)으로 배양액을 교체하여 주었다.

2) 골격근 검체 동결박절

질소 용액이 담긴 용기에 isopentane (Junsei Chemical Co,

Tokyo, Japan)이 반쯤 채워진 비커를 중탕시키고, isopentane이 점성이 생길 정도로 온도가 낮아지면, 준비된 근조직 생검을 동결박절하기 좋게 정리하여 몇 초간 담근 후 -20°C 냉동고에서 30분간 보관 후 -70°C 냉동고로 옮겨 보관하였다. 조직의 슬라이드 제작을 위하여 동결시킨 검체를 $7\ \mu\text{m}$ 두께로 동결박절하였다.

3) 면역조직화학 염색

세포배양한 슬라이드를 차가운 메탄올(Junsei Chemical Co, Tokyo, Japan)과 아세톤(Junsei Chemical Co, Tokyo, Japan) 1:1 혼합용액에 고정시킨 후, 2% bovine serum albumin (BSA; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)용액으로 블로킹시켰다. Dysferlin 항체(Novocostra Lab, Newcastle, UK)를 실온에서 1시간 30분간 반응시킨 후 세척하고, biotin conjugated anti-mouse IgG (Vector Lab, burlingame, CA, USA)를 실온에서 30분간 반응시켰다. 다시 세척 후 fluorescein avidin D (Vector Lab, burlingame, CA, USA)를 30분간 실온에서 불린 후 세척하고 봉합하였다.

근조직의 경우에는 슬라이드를 차가운 아세톤에 고정시킨 후 위의 세포 배양한 슬라이드와 동일한 과정의 첫 번째 염색을 하고 난 뒤, 두 번째 블로킹을 앞의 조건과 같이 시행한 후 N-CAM 항체(Santa cruz Biotechnology, Santa cruz, CA, USA)를 4°C 에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 후 세척하고 rhodamin conjugated anti rabbit IgG (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA)를 1시간 불었다. 마지막으로 세척하고 슬라이드를 말린 후 봉합하고 결과를 현미경 상에서 확인하였다.

4) 단백질 추출 및 웨스턴 블롯팅(western blotting)

배양한 근세포와 동결 박절한 근조직을 같은 방법으로 tris base 125 mM pH6.8 (Sigma aldrich Co, St. Louis, MO, USA), sodium dodecyl sulfate 4% (SDS; Amresco Co, Solon, OH, USA), glycerol 10% (Amresco Co, Solon, OH, USA), mercaptoethanol 5% (Sigma aldrich Co, St. Louis, MO, USA), dithiothreitol 100 mM (DTT; Amresco Co, Solon, OH, USA), phenylmethylsulfonyl fluoride 5 mM (PMSF; Amresco Co, Solon, OH, USA)가 함유된 용액에 넣고 얼음 위에서 초음파 처리하여 균질화시킨 후 5분간 가열하고 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 분리하여 -70°C 에 보관하였다가 사용 직전 Bio-rad protein assay kit (Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 bradford 방법으로 정량하였다.

Bromophenol blue (Sigma aldrich Co, St. Louis, MO, USA)를 첨가한 동량의 단백질을 Bio-rad mini-protein II cell (Bio-rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 acryl-amide gel (Bio-rad, Hercules, CA, USA)에 전기영동하고 polyvinylidene fluoride (PVDF; Millipore, Bedford, MA, USA) 막(membrane)으로 이동시켰다. 이동된 막을 5% skim milk (Becton Dickson, Sparks, MD, USA), 0.05% tween 20 (Amresco Co, Solon, OH, USA) tris base 용액에 실온에서 1시간 블로킹시킨 후 dysferlin 항체 또는 actin 항체(Santa cruz Biotechnology, Santa cruz, CA, USA)를 실온에서 3시간 동안 반응시키고 세척하였다. 세척 후 peroxidase conjugated anti mouse IgG (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) 또는 peroxidase conjugated anti rabbit IgG (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)를 실온에서 1시간 반응시키고 다시 세척 후 발색 반응은 enhanced chemi-luminescence (ECL; Amersham, Arlington Heights, IL, USA)를 이용하여 필름에 감광시키고 광학밀도(optical density; O.D)는 Quantity one 소프트웨어(Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하고 비교하였다.

결 과

1. 근세포에서의 dysferlin 발현

정상인의 근조직을 이용하여 얻어진 근육모세포와 근관세포의 dysferlin 발현 정도를 면역조직화학 염색법으로 비교하여 보면 근육모세포에서 근관세포로의 분화 시 세포막과 세포질에서의 단백 발현이 증가한 것을 볼 수 있었다(Fig. 1).

세포 배양 시의 세포 수 증가 등으로 인한 오차를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯팅을 이용해 정량적으로 단백 발현을 확인해 보았다. 일정한 양을 보이는 actin의 사진과 비교하여 보면, 근육모세포에서는 dysferlin의 발현이 적어 거의 밴드를 확인할 수 없었고 근관세포에서는 발현된 양의 증가로 진한 밴드를 볼 수 있었다. 이를 농도계(densitometer)를 이용하여 측정해 본 결과를 그래프상으로 보면 근육모세포에서 근관세포로 분화하면서 7배 가까이 dysferlin이 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

2. 정상인 근조직에서의 dysferlin 발현

근병증을 가진 환자와의 dysferlin 발현 양상을 비교하기 위하여, 8명의 정상인 근조직을 대조군으로 사용하여 dysferlin

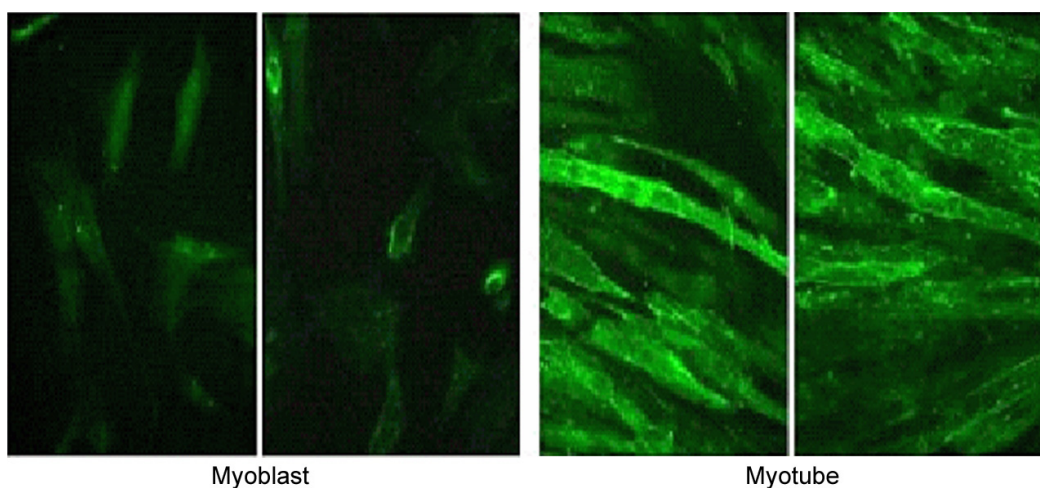


Figure 1. Immunohistochemical staining of myoblast/myotube for dysferlin. ($\times 200$ magnification)

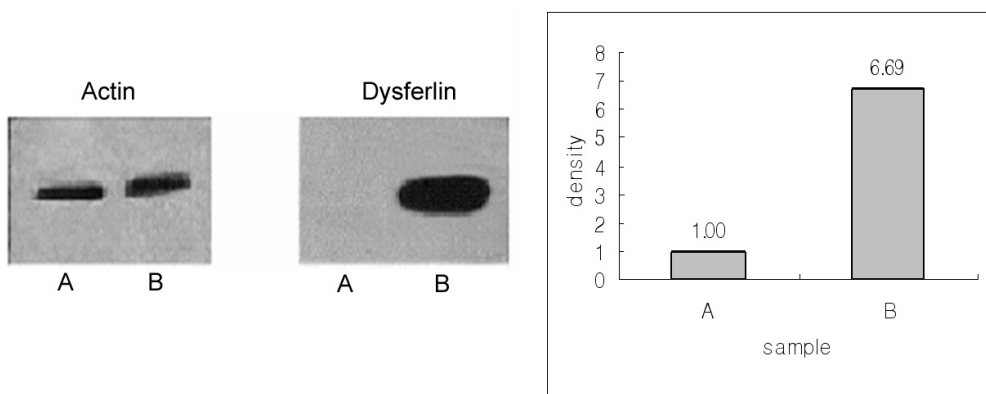


Figure 2. Western blotting in myoblast(A), myotube(B) for dysferlin. Graph shows the relative density of dysferlin in myoblast/myotube.

단백의 발현 분포와 증감을 확인하였다. 실험 방법은 배양된 근

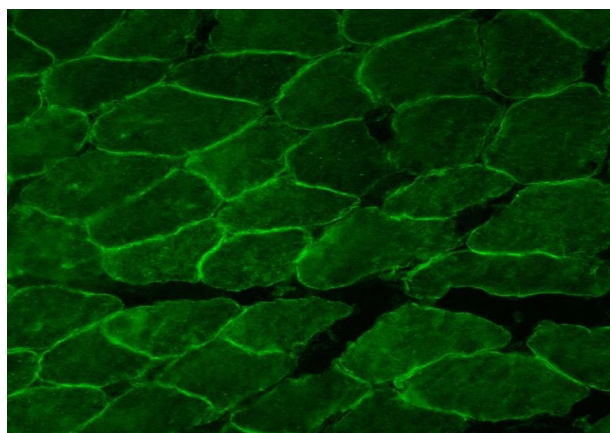


Figure 3. Immunohistochemical staining of normal control for dysferlin. ($\times 200$ magnification)

세포와 같이 면역조직화학 염색법과 웨스턴 블롯팅을 시행하였다. Dysferlin 항체를 이용한 면역조직화학 염색 슬라이드상에서는 근섬유막에 일정한 형태와 농도로 dysferlin이 염색된 모습을 관찰할 수 있었으며, 이를 웨스턴 블롯팅 법으로 정량적인 확인을 하여 8명의 정상인 근조직에서 모두 비슷한 양의 dysferlin 단백질이 일정하게 발현되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3, 4).

3. 뒤시엔느형 근이영양증 환자 근조직에서의 dysferlin 발현

뒤시엔느형 근이영양증 환자군의 dysferlin과 N-CAM을 이용한 이중 염색 사진을 보면 괴사와 재생이 진행되는 근섬유 조직에 dysferlin이 강하게 발현된 모습을 볼 수 있었다. 또한 근조직의 재생 표지인자인 N-CAM 항체를 이용해 염색한 사진과 비교하여 보면 dysferlin과 정확하게 염색된 부위가 공통으

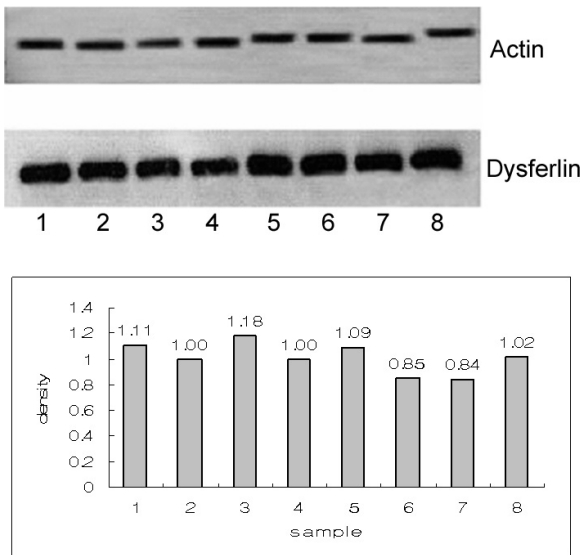


Figure 4. Western blotting in normal control groups for dysferlin. Graph shows the relative density of dysferlin in normal control groups. (Average of relative density: 1.01)

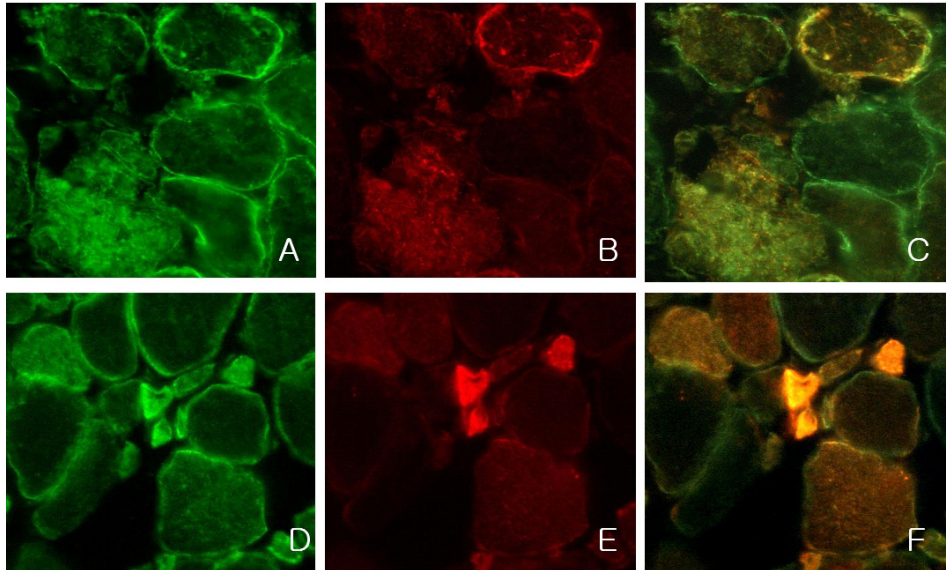


Figure 5. Double immunohistochemical staining of DMD patients for dysferlin & N-CAM. A/D: Dysferlin, B/E: N-CAM, C/F: Double. ($\times 200$ magnification)

로 지역화 되어 겹쳐지는 모습을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

6명의 뒤시엔느형 근이영양증 환자군의 단백 발현을 정량적 웨스턴 블롯팅에서 1번 정상인 대조군과 비교하여 보면 농도의 전체적인 평균치는 1.01로 정상인 대조군과 거의 차이가 없으나 3번의 큰 증가와 5번의 감소 등 dysferlin 단백질 발현양이 환자마다 큰 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 음성 대조군으로 사용된 dysferlinopathy 환자의 단백질 발현되지 않은 모습도 2번에서 볼 수 있었다(Fig. 6).

4. 다발성근염과 피부근염 환자 근조직에서의 dysferlin 발현

다발성근염과 피부근염을 가진 두 환자군의 이중 면역조직 화학 염색한 사진을 보면 뒤시엔느형 근이영양증 환자군과 같이 재생하고 있는 근섬유조직에서 dysferlin이 강하게 발현되고 N-CAM과 정확하게 공통으로 지역화한 모습을 확인할 수 있었다. 특히, 피부근염 환자의 경우 염증이 심한 부위가 다른 부위에 비해 전체적으로 세포질에 진하게 염색된 모습을 볼 수 있었다(Fig. 7).

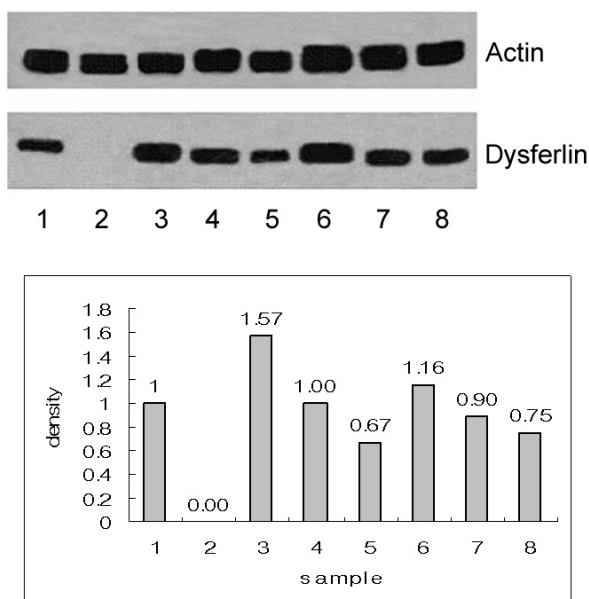


Figure 6. Western blotting in DMD patients for dysferlin. Graph shows the relative density. 1: Normal control, 2: dysferlinopathy, 3-8: DMD. (Average of relative density in DMD: 1.01)

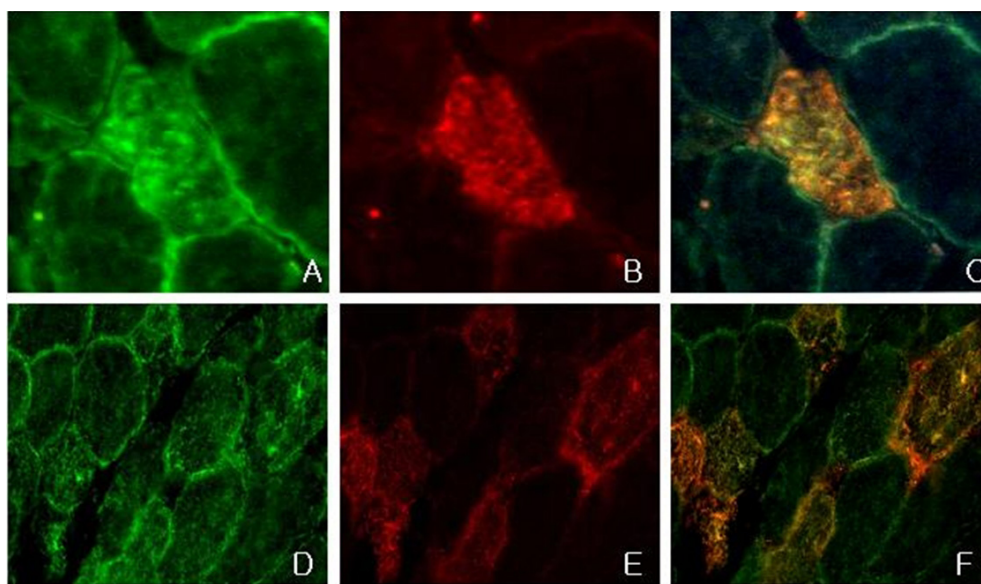


Figure 7. Double immunohistochemical staining of PM and DM patients for dysferlin & N-CAM. A/D: Dysferlin, B/E: N-CAM, C/F: Double. ($\times 200$ magnification)

2명의 다발성근염 환자군과 2명의 피부근염 환자군의 정량적 단백질분석 결과를 확인하여 보면, 1번 정상인 근조직의 dysferlin 단백질 발현과 비슷하거나 낮아진 농도를 보였고, 전체적인 평균치는 0.81로 감소하였다. 특히 다발성근염 환자 중 한 명에서는 dysferlin의 발현이 크게 감소하였고, 이로 인해 전체적인 평균치의 감소를 가져왔다. 이 환자의 경우 근육조직이 이미 파괴가 많이 진행되어 이와 같은 현상을 보인 것으로 추측되고, 따라서 이로 인한 평균치의 감소는 질환의 유무와는 관계가 없으며 크게 유의하다고 생각되지 않는다(Fig. 8).

고 찰

Dysferlin은 DGC와 관계없이 독립적으로 근섬유막에 위치하는 단백질이다. 근섬유막에 존재하는 DGC는 세포 외부의 기질과 세포 내부의 세포 골격을 연결하는 단백질 다구조단위 복합체로서, 구성 요소 중 하나의 손실은 근섬유막 전체 구조의 안정화를 깨뜨리고 세포외 기질과 세포내 세포골격 간의 막을 통해 생기는 연결의 손실 원인이 된다.^{21,22} 최신 연구에 따르면 dysferlin-null mice에서 DGC의 기능이 유지되고 원형질막의

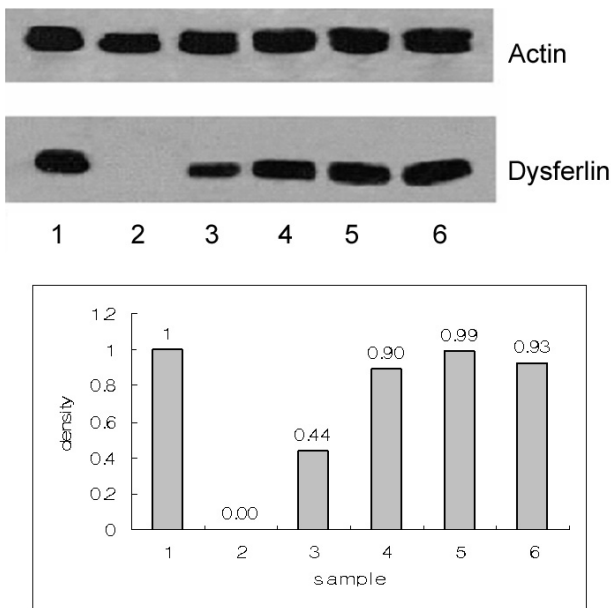


Figure 8. Western blotting in PM & DM patients for dysferlin. Graph shows the relative density. 1: Normal control, 2: dysferlinopathy, 3/4: PM, 5/6: DM. (Average of relative density in PM & DM: 0.81)

구조도 안정화되어 있었으나, 느리게 전개되는 진행성 근이영양증은 근세포 원형질막의 치유상 결함에 의해서 발생한다. 결과적으로 DGC 관련 근이영양증과 반대로 dysferlin 관련 근이영양증은 구조적 이상이 아닌 원형질막의 손상 시 치유 부위가 변성되어 유도되는 새로운 분류의 질병이다. 이것이 dysferlin이 결핍된 근이영양증의 병리학적 기전이다.^{8,12,23,24}

본 실험에서 정상인으로 이루어진 대조군에서는 dysferlin이 면역조직화학 염색에서 일정하게 분포 및 발현되고, 웨스턴 블롯팅 정량 실험 결과에서도 8명의 정상인 근조직에서 표현된 단백질 양이 거의 비슷한 일정량을 보였다. 그러나 이와 대조적으로 음성 대조군으로 사용된 dysferlinopathy 환자의 근조직에서는 예상대로 면역조직화학 염색과 웨스턴 블롯팅 실험상에서 단백질 발현이 되지 않았다. 뒤시엔느형 근이영양증 환자군의 경우, DGC의 중요 구성 요소인 dystrophin이 손실되어 이미 세포의 형태가 파괴되고 괴사가 일어나 이를 치유하기 위해 위성세포라 추측되는 세포들이 생성된 모습을 볼 수 있었다. 또한 위성세포와 재생 중인 근조직의 표지 인자로 여겨지는 N-CAM²⁵은 이중 면역조직화학 염색한 사진상에서 보면, dysferlin과 공통 지역성을 띄며 거의 비슷한 모습으로 증가한 것을 볼 수 있었다. Dysferlin은 근병증을 가진 근조직에서 활성화된 위성세포를 증가시킨다고 보고된 바 있다.²⁰ 이는 dysferlin이 소포를 형성하여 재융합하고 위성세포를 활성화시켜 파괴된 근조직을 치유하려는 과정으로 추측되어진다. Dysferlin이 발견되었을 때, 유일하게 알려져 있던 연관된 유전자는 *Caenorhabditis elegans*의 fer-1이었다. fer-1의 돌연변이는 정자세포의 원형

질막 융합을 일으키는 막 구조로 된 세포소기관의 결핍을 일으켜 불임을 유발한다.²⁶ Dysferlin은 fer-1과 유사한 다수의 C2 영역과 C-말단의 세포막을 가로지르는 영역을 가진 큰 단백질(230kDa)이다. 이 C2 영역은 일반적으로 칼슘 의존 인지질 결합(calcium dependent phospholipid binding)과 단백질-단백질 상호작용에 연관되어 있다. Dysferlin의 C2영역은 신경전달물질이 방출되는 동안 막 융합을 위한 칼슘 감지 장치로서 관련된 synaptotagmins의 C2A 영역과 매우 높은 상동관계를 가지고 있다.²⁷ 이런 자료로부터, dysferlin은 근세포의 발생과 유지 과정 동안 융합의 중요한 역할을 할 것이라는 가정을 할 수 있다. 근조직 내 융합은 두 가지 유형으로 분류 가능한데, 첫째 융합은 근육 내에서 단핵의 근육모세포가 다핵의 합포체 근관세포를 형성하기 위하여 일어나는 것이고, 두 번째 유형의 근육 막 융합은 운동과 근육 손상 시에 생긴 막의 찢어진 곳을 치유하는 데 필요한 재융합과 연관이 있다. 원형질막의 치유는 막 파괴 시 재융합을 위해 필요한 기초적인 세포 생성 과정이다.²⁸⁻³⁰ 막 융합의 두 유형이 진행되는 과정에서 소포는 나란히 존재하는 막의 융합을 촉진하기 위하여 원형질막과 융합한다고 생각되어진다.^{31,32} 뒤시엔느형 근이영양증 환자군의 웨스턴 블롯팅 결과는 정상인의 근조직에서 표현된 단백질의 양과는 다르게 심한 증가와 감소의 모습을 보이는데, 이는 각 조직에서 표현된 단백질 양의 증감이 근조직의 파괴 정도에 따라 보이는 차이로 여겨진다. 파괴가 심하게 되어 더 이상의 재생이 힘든 경우나 퇴화가 많이 진행되지 않은 조직에서의 능동적 치유 과정을 보여주는 것이라 추측된다.

또한, 다발성근염과 피부근염 환자군의 실험 결과 자료는 전체적으로 뒤시엔느형 근이영양증의 경우보다 일정한 크기와 형태의 세포가 유지되는 모습을 보여주었다. 그러나 정상인의 근조직과는 다르게 특정 부위나 세포에 N-CAM과 dysferlin이 면역조직화학 염색에서 강한 반응을 나타내었다. 특히, 피부근염 환자군의 경우 거의 정상조직과 같은 모습을 보였으나 염증 반응이 심한 쪽에서만 전체적으로 세포막뿐만 아니라 세포질까지 dysferlin이 증가한 모습을 보였다. 이전에 보고된 연구들에 따르면, 세포질 내의 dysferlin 축적이 퇴화/재생하고 있는 근섬유 조직에서 발견되었으며, 이것은 재생과 같은 근섬유의 능동적 과정 시에 dysferlin이 중요한 역할을 한다는 것을 보다 더 지지해 주는 것이다.³³ 이를 웨스턴 블롯팅하여 정량 측정한 결과를 보면 다발성근염 환자 1명을 제외하고는 정상인과 거의 차이가 나지 않는 모습을 볼 수 있었다.

Dysferlin과 C2 영역을 포함하여 비슷한 구조의 여러 유전자들을 공유하는 단백질들인 ferlin family 중 myoferlin은 dysferlin과 가장 유사하다. Mouse cell line C2C12에서 시행된 myoferlin과 dysferlin이 관련된 이전 실험 결과에 따르면, myoferlin은 융합 반응이 있기 전 길어진 근육모세포에서 많이 발현되었고, 반면에 dysferlin은 근육모세포가 근관세포를 형성한 융합 반응 후에 최고로 많이 발현되었다.¹⁷ Myoferlin과 dysferlin의 이와 같은 뚜렷한 표현형은 근육 융합의 특정 과정에 따라 단백질이 전문화될 수 있다고 제안한다. 따라서 myoferlin은 근발생 과정 동안 중요한 역할을 하고, 반면 dysferlin은 성숙한 근섬유에서 치유를 담당할 것이라 여겨진다. 그러나 그들의 높은 상동성으로 인하여 서로를 보완할 것이라고도 제안되고 있다.³²

본 실험에서 근세포 배양 결과를 보면, myoferlin의 경우는 실험을 시행하지 않아 확인할 수 없었으나 dysferlin이 면역조직화학 염색에서뿐만 아니라 웨스턴 블롯팅 실험 결과에서도 근육모세포가 근관세포로 분화되면서 7배 가까이 증가한 것을 볼 수 있었다. 이는 근세포의 발생과 유지, 분화 과정 동안의 융합 반응 시에 dysferlin이 중요 역할을 한다는 것을 지지해 주는 것이다.

Dysferlin과 관련된 대표적인 단백질인 caveolin-3의 경우에는, dysferlin이 완벽하게 결핍된 지대형 근이영양증 2B형/미요시 근병증 환자 4명 중 3명의 환자에서 이차적 caveolin-3의 감소를 나타냈고, caveolin-3 결핍증인 지대형 근이영양증 1C형(primary caveolin-3 deficiency; LGMD1C)에서는 dysferlin의 두드러진 감소가 발견되었다. 이는 골격근 내의 caveolin-3와 dysferlin 사이의 상호작용을 제안하고 있다. 또한 이 과정은 정상인 근이영양증이 없는 근육의 용해물 내의 dysfer-

lin과 caveolin-3의 공통 면역침강 반응에 의해서 보다 더 지지되는 바이다.^{34,35}

이상의 결과들을 정리해 보면, 질환에 따른 전체적인 일정한 증감의 양상은 없으나 파괴로 인한 세포의 치유를 위하여 염색된 세포 각각에서 dysferlin이 증가한 모습을 볼 수 있었다. 또한 근육모세포가 근관세포로 분화되는 과정인 융합 시에도 증가한 dysferlin의 발현을 볼 수 있었다. 이는 치유와 재생 과정 그리고 근세포의 분화 과정에서 dysferlin이 중요한 역할을 한다는 그 동안의 여러 연구들을 지지하는 바라 여겨진다.

이러한 연구 결과는 dysferlin 발현 증가와 관련된 근병증 치료법 연구에 도움이 될 수 있을 것이라 사료되며, 또한 이를 좀 더 빨리 실용화하기 위해서는 dysferlin의 기능과 관련된 것으로 알려진 myoferlin, caveolin-3 등의 다른 요소나 칼슘 신호, 염증 반응 등과 관련된 연구가 보다 더 필요하다고 생각되는 바이다.

REFERENCES

1. Bushby KM. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain* 1999;122:1403-1420.
2. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;20:31-36.
3. Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Palmer J, et al. Distal anterior compartment myopathy: A dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 2001;49:130-134.
4. Bushby KM. Dysferlin and muscular dystrophy. *Acta Neurol Belg* 2000;100:142-145.
5. Selcen D, Stilling G, Engel AG. The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurol* 2001;56:1472-1481.
6. Britton S, Freeman T, Vafiadaki E, Keers S, Harrison R, Bushby K, et al. The third human FER-1-like protein is highly similar to dysferlin. *Genomics* 2000;68:313-321.
7. Fanin M, Angelini C. Muscle pathology in dysferlin deficiency. *Neuropath Appl Neurobiol* 2002;28:461-470.
8. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003;423:168-172.
9. Lennan NJ, Kho A, Bacskaï BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH Jr. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem* 2003;278:50466-50473.
10. De Palma S, Morandi L, Mariani E, Begum S, Cerretelli P, Wait R, et al. Proteomic investigation of the molecular pathophysiology of dysferlinopathy. *Proteomics* 2006;6:379-385.
11. Cenacchi G, Fanin M, De Giorgi LB, Angelini C. Ultrastructural changes in dysferlinopathy support defective membrane repair mechanism. *J Clin Pathol* 2005;58:190-195.

12. De Luna N, Gallardo E, Illa I. In vivo and in vitro dysferlin expression in human muscle satellite cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:1104-1113.
13. Bansal D, Campbell KP. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* 2004;14:206-213.
14. Campanaro S, Romualdi C, Fanin M, Celegato B, Pacchioni B, Trevisan S, et al. Gene expression profiling in dysferlinopathies using a dedicated muscle microarray. *Hum Mol Genet* 2002;11:3283-3298.
15. Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, Yamanaka G, Matsumura T, Goto K, et al. Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. *J Neurol Sci* 2003;211:23-28.
16. Doherty KR, Cave A, Davis DB, Delmonte AJ, Posey A, Early JU, et al. Normal myoblast fusion requires myoferlin. *Development* 2005;132:5565-5575.
17. Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, et al. The sarcolemmal protein dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 2001;10:1761-1766.
18. Davis DB, Doherty KR, Delmonte AJ, McNally EM. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *J Biol Chem* 2002;277:22883-22888.
19. Salani S, Lucchiari S, Fortunato F, Crimi M, Corti S, Locatelli F, et al. Developmental and tissue-specific regulation of a novel dysferlin isoform. *Muscle Nerve* 2004;30:366-374.
20. De Luna N, Gallardo E, Soriano M, Dominguez-Perles R, De la Torre C, Rojas-Garcia R, et al. Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "in vitro". *J Biol Chem* 2006;281:17092-17098.
21. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3710-3714.
22. Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 1997;139:375-385.
23. Matsuda C, Aoki M, Hayashi YK, Ho MF, Arahata K, Brown RH Jr. Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurology* 1999;53:1119-22.
24. Bittner RE, Anderson LV, Burkhardt E, Bashir R, Vafiadaki E, Ivanova S, et al. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet* 1999;23:141-142.
25. Illa I, Leon-Monzon M, Dalakas MC. Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Ann Neurol* 1992;31:46-52.
26. Achanzar WE, Ward S. A nematode gene required for sperm vesicle fusion. *J Cell Sci* 1997;110:1073-1081.
27. Fernandez-Chacon R, Koniqstorfer A, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, Steves CF, et al. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 2001;410:41-49.
28. McNeil PL, Steinhardt RA. Loss, restoration and maintenance of plasma membrane integrity. *J Cell Biol* 1997;137:1-4.
29. McNeil PL, Baker MM. Cell surface events during resealing visualized by scanning-electron microscopy. *Cell Tissue Res* 2001;304:141-146.
30. McNeil PL, Vogell SS, Miyake K, Terasaki M. Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *J Cell Sci* 2000;113:1891-1902.
31. Kalderon N, Gilula NB. Membrane events involved in myoblast fusion. *J Cell Biol* 1979;81:411-425.
32. Doherty KR, McNally EM. Repairing the tears: dysferlin in muscle membrane repair. *Trends Mol Med* 2003;9:327-330.
33. Piccolo F, Moore SA, Ford GC, Campbell KP. Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies. *Ann Neurol* 2000;48:902-912.
34. Walter MC, Braun C, Vorgerd M, Poppe M, Thirion C, Schmidt C, et al. Variable reduction of caveolin-3 in patients with LGMD2B/MM. *J Neurol* 2003;250:1431-1438.
35. Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, et al. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 2001;10:1761-1766.